

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-324037

(43) 公開日 平成7年(1995)12月12日

(51) IntCl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 35/78	ACB	Y 8217-4C		
// A 6 1 K 31/35				
31/70				
C 0 7 D 311/30				

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平5-64757

(22) 出願日 平成5年(1993)3月1日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年9月29日～  
9月30日 日本生薬学会開催の「日本生薬学会 第39回  
年会」において文書をもって発表

(71) 出願人 391036518

日本月桃株式会社

沖縄県那覇市久茂地2-8-1

(72) 発明者 奥山 徹

神奈川県川崎市宮前区白幡台1-10-18

(72) 発明者 佐藤 信幸

東京都保谷市本町6-16-6

(72) 発明者 野村 敬一

沖縄県那覇市西2丁目12番1-1303号 フ

ァミール西町ポートサイド

(74) 代理人 弁理士 藤野 清也

(54) 【発明の名称】 月桃から血小板凝集抑制物質の製造法

(57) 【要約】

【構成】 月桃の葉体を酢酸エチルエステルで抽出し、  
抽出液をシリカゲルを担体としてn-ヘキサン-酢酸エ  
チルエステルを溶媒として濃度勾配クロマトグラフィー  
を行って血小板凝集抑制物質を製造する方法。凝集抑制  
物質としてクエルセチン及びその配糖体がある。

【効果】 血小板凝集抑制物質を収率よく工業的に有利に  
採取することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 月桃の葉体を酢酸エチルエステルで抽出し、該抽出液をシリカゲルを担体とし、 $n$ -ヘキサン→酢酸エチルエステル(10:1→1:1)→酢酸エチルエステル→メタノール→80%メタノール水溶液の溶媒で濃度勾配カラムクロマトグラフィーを行って分画し、血小板凝集抑制作用を指標にして血小板凝集抑制作用の高い画分を選択し、該画分から血小板凝集抑制物質を採取することを特徴とする血小板凝集抑制物質の製造法。

【請求項2】 月桃の葉体として乾燥葉体の $n$ -ヘキサン抽出残渣を用いる請求項1記載の製造法。

【請求項3】 血小板凝集抑制物質の採取が、血小板凝集抑制作用の高い画分を $n$ -ヘキサン→酢酸エチルエステルを溶媒として用い濃度勾配シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ってクエルセチンを採取するものである請求項1記載の製造法。

【請求項4】 血小板凝集抑制物質の採取が、血小板凝集抑制作用の高い画分を $n$ -ヘキサン→酢酸エチルエステル(3:1→1:1)→酢酸エチルエステル→メタノールを溶媒として濃度勾配シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、さらにその分画画分のうちで血小板凝集抑制作用の高い画分を選択し、 $n$ -ヘキサン→酢酸エチルエステル(3:1→1:10)→酢酸エチルエステル→メタノール→80%メタノール水溶液を溶媒として用いて濃度勾配シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行ってクエルセチンの3位にラムノースが結合した配糖体(クエルシトリン)を採取するものである請求項1記載の製造法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、ショウガ科(Gingiberaceae) *Alpinia* 属に属する月桃から血小板凝集抑制作用の高い物質、特にクエルセチン(Quercetin) 及びその配糖体を収率よく工業的に採取する方法に関する。得られたクエルセチン及びその配糖体は血管透過性を減少させ、血小板凝集抑制作用を有し、医薬品として利用される。

## 【0002】

【従来の技術】月桃(ゲットウ)は、ショウガ科の *Alpinia* 属に属し、沖縄から九州南端に自生する常緑多年生草本である。従来、その葉体は独特の芳香を有し、葉体から精油を抽出してダニやカビなどの防虫、防黴剤として用いられ、あるいは茎を繊維として利用することが行われていた。本発明者らは、この月桃のさらに高度の利用について検討を行ったところ、その葉体の酢酸エチルエステル抽出物が線溶活性を強く阻害し、血小板凝集抑制作用があることを見出した。そこで、血小板凝集抑制作用を指標にこの抽出物を分画し活性本体を追求したところ、クエルセチン及びその配糖体に高い血小板凝集抑制作用があることを見出した。そしてさらに、月

桃中には、クエルセチン及びその配糖体が多量に含有されており、これを工業的に抽出し、生産できることを見出して本発明を完成するに至った。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】すなわち、本発明は、月桃の葉から血小板凝集抑制物質、特にクエルセチン及びその配糖体を工業的に製造する方法を提供することを課題とする。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、月桃の葉を酢酸エチルエステルで抽出し、該抽出液をシリカゲルを担体として $n$ -ヘキサン→酢酸エチルエステル(10:1→1:1)→酢酸エチルエステル→メタノール→80%メタノール水溶液の溶媒で濃度勾配カラムクロマトグラフィーを行って分画し、血小板凝集抑制作用の高い画分から血小板凝集抑制物質を採取することよりなる血小板凝集抑制物質の製造法に関する。さらに、本発明は、上記画分から血小板凝集抑制物質としてクエルセチン及びその配糖体を分画採取する方法に関する。

【0005】月桃は、前記したようにショウガ科の *Alpinia* 属植物であって、月桃(*Alpinia pesionsa* K. Schum.)、タイリン月桃(*Alpinia urarensis* Hay.)、フィリ月桃(*Alpinia sanderae* Sand.)、ヤクチ(*Alpinia oxyphylla* L.)、タイワン月桃(*Alpinia* sp.)等が存在する。本発明では、タイリン月桃がクエルセチンの含量が高いので原料として使用することが望ましい。本発明では、これらの月桃の葉体にクエルセチンが含有されているので、葉体を使用する。葉体は、天日乾燥、熱風乾燥等を行なって乾燥して使用することがクエルセチン抽出効率を高めるので望ましい。月桃の葉体は、酢酸エチルエステルで抽出するに先立って前処理として $n$ -ヘキサンで抽出すると、クエルセチンに類似する化合物、その他の不純物を抽出除去することができ、クエルセチンの収率をより一層高めるので望ましい。

【0006】次に、得られた $n$ -ヘキサン抽出残渣を酢酸エチルエステルで抽出する。この抽出は乾燥葉体2kg重量部に対し酢酸エチルエステル12kg~14kgを加えて常温で数時間攪拌抽出する。抽出は数回行なうことが望ましい。このようにするとクエルセチン及びその配糖体がほとんど酢酸エチルエステル中に抽出される。この抽出エキ스는線溶活性を強く阻害する作用を示す。そこで、このエキスをそのままあるいは濃縮してシリカゲルカラムを用い $n$ -ヘキサン→酢酸エチルエステル(10:1→1:1)→酢酸エチルエステル→メタノール→80%メタノール水溶液で濃度勾配カラムクロマトグラフィーを用いて分画を行い、血小板凝集抑制作用(PRP-PPP法による)を指標に血小板凝集抑制作用の強い画分を採取する。この画分はそのままあるいはそれを精製して乾燥し、血小板凝集抑制物質として用いる。

【0007】しかし、さらにこの画分(I)をシリカゲルカラムを担体とし、*n*-ヘキサン-酢酸エチルエステルを溶媒として濃度勾配クロマトグラフィーを行ってクエルセチン含有量の高い画分を分画し、この画分からクエルセチンを結晶として採取する。結晶化には、通常化学物質の結晶化に用いられるどのような方法でも用いることができるが、好ましくは再結晶化する方法が望ましい。また前記画分(I)をシリカゲルカラムを担体として用い*n*-ヘキサン-酢酸エチルエステル(3:1→1:1)→酢酸エチルエステル→メタノールを溶媒とし

10 濃度勾配カラムクロマトグラフィーを行って分画し、その分画画分のうちで血小板凝集抑制作用の強い画分を選択し、この画分をさらにシリカゲルカラムを担体として用いて*n*-ヘキサン-酢酸エチルエステル(3:1→1:10)→酢酸エチルエステル→メタノール→80%メタノール水溶液を溶媒として用いて濃度勾配クロマトグラフィーを行い、この分画液からクエルセチンの3位にラムノースが結合した配糖体を結晶として採取する。結晶化には、通常化学物質の結晶化に用いられるどのような方法でも用いることができるが、好ましくは、メタ

20 ノールにて再結晶する方法が好ましい。

【0008】本発明の方法で得られる化合物がクエルセチン及びその配糖体であることは、実施例で示すように結晶の融点、MS、<sup>1</sup>H-NMR及び<sup>13</sup>C-NMRスペクトルから確認した。また、これらの物質が血小板凝集抑制作用を有し、血小板凝集抑制物質であることは、実施例に示すような測定方法によって確認した。従って、これらの物質は、血小板凝集作用を有する医薬品として有用に利用される。本発明の方法によるとクエルセチン

30 は葉体(乾燥物)当り0.2~0.3%、クエルセチン配糖体を0.3~0.4%採取することができる。

【0009】また、本発明では、シリカゲルを担体として用い前記溶媒を用いて濃度勾配クロマトグラフィーを行ったときのみクエルセチン及びその配糖体を他の成分から効率よく高い収率で分離することができる。それ以外のカラム、例えばイオン交換樹脂等を用いたりあるいは他の溶剤を用いた場合にはクエルセチン及びその配糖体を収率よく得ることができない。

【0010】本発明で得られた血小板凝集抑制物質、クエルセチン及びその配糖体は、種々の方法により製剤化

40 して脳血栓、動脈硬化、心筋梗塞等の予防あるいは治療\*

\*に用いることができる。投与量は症状、性別、年齢等において相違するが、成人一日当り1mg~2gを一日一回乃至数回に分けて投与することが望ましい。製剤化は、粉末、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、シロップ剤、トローチ剤等として経口的に投与してもよく、また静注、皮下注、筋注等として投与してもよい。さらに、軟膏、貼付剤、座剤等非経口的に投与することもできる。これらの製剤中には必要に応じて製剤上知られている賦形剤、崩壊剤、滑沢剤等種々の添加剤を配合することもできる。さらに、本発明で得られる物質は、食品中に添加して脳血栓の予防あるいは治療効果を持たせた機能性食品を製造することもできる。このような食品には、麺、パン、かまぼこ、ソーセージ、スープ、アイスクリーム、ヨーグルト、ジュース、その他の飲料等がある。

【0011】次に実施例及び試験例をあげて本発明を具体的に説明する。

#### 【実施例1】

##### クエルセチンの採取

タイリン月桃の葉体を採取し、これを天日で乾燥した。その5.1kgに*n*-ヘキサン36リットルを加えて70℃で3時間環流して抽出した。この抽出を3回行い、抽出残渣に酢酸エチルエステル36リットルを加えて60℃で3時間環流して抽出を行った。この抽出を3回行い、抽出液を集めた。この抽出液を減圧下50℃で濃縮乾燥し、濃縮乾燥物501gを得た。この抽出物501gをシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって分画した。すなわちφ8×90cmのカラムを用いシリカゲルを担体として順次*n*-ヘキサン-酢酸エチルエステル(10:1→1:1)→酢酸エチルエステル→メタノール→80%メタノールを溶媒として用いて濃度勾配クロマトグラフ処理を行い、フラクション1~100の画分に分画した。そしてこの最初に分画されたフラクション1及び2の画分を再度シリカゲルを担体として*n*-ヘキサン-酢酸エチルエステルを溶媒として用いて濃度勾配クロマトグラフ処理し、流出液を分取して結晶化させ結晶1gを得た。

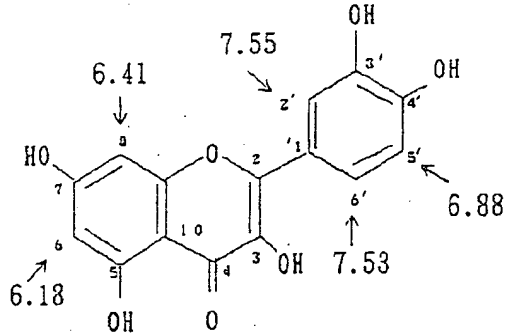
【0012】この結晶は、融点123~125℃(分別)の結晶であってMS(*m/z*)302を示した。また、<sup>13</sup>C-NMRのスペクトル(DMSO-d<sub>6</sub>)は、次のとおりであった。

C-2	146.8	C-1'	122.1
3	135.8	2'	115.2
4	175.8	3'	145.1
5	160.6	4'	147.7
6	98.4	5'	115.7
7	164.0	6'	120.1
8	93.5		
9	156.2		
10	103.1		

5

上記物理化学的性質はクエルセチンの物理化学的性質と一致し、次の構造を示すクエルセチンであることが確認された。

【化1】



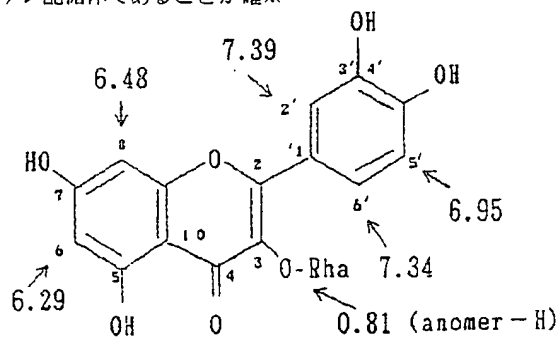
〔式中の数値は、クエルセチンの<sup>1</sup>H NMRスペクトルのケミカルシフト値 (DMSO-d<sub>6</sub> 溶媒中) を示す。〕

C-2	156.7
3	134.6
4	178.0
5	161.6
6	99.0
7	164.4
8	93.9
9	157.5
10	104.5
1'	121.4
2'	115.9
3'	145.4
4'	148.7
5'	116.1
6'	121.1

上記物理化学的性質は、クエルセチンの3位にラムノースがエステル結合した配糖体の物理化学的性質と一致し、次の構造を示すクエルセチン配糖体であることが確認

※認められた。

【化2】



〔式中の数値は、クエルセチン配糖体 (クエルシトリン) の<sup>1</sup>H NMRスペクトルのケミカルシフト値 (DMSO-d<sub>6</sub> 溶媒中) を示す。〕

★【0015】

【実施例3】

★50 クエルセチン及びそのラムノース配糖体のウサギ血小板

6

\* 収率：乾燥葉体に対し0.01%

【0013】

【実施例2】

クエルセチン配糖体の採取

実施例1の方法で得られたフラクション9の画分をシリカゲルカラムにかけ、n-ヘキサン-酢酸エチルエステル (3:1→1:1) →酢酸エチルエステル→メタノール溶媒を用いて濃度勾配クロマトグラフィーを行い、フラクション1~30の画分を得た。このフラクション17~21の画分をさらにシリカゲルカラムにかけn-ヘキサン-酢酸エチルエステル (3:1→1:10) →メタノール→80%メタノールの溶媒を用いて溶出し、溶出液を静置沈殿化し析出した結晶をデカンテーション処理後メタノールにて再結晶させ結晶2を得た。

【0014】結晶2は、融点177~180°C (dec) の結晶で、MS (m/z) 488、<sup>13</sup>C-NMRスペクトル (DMSO-d<sub>6</sub>) は次のとおりであった。

C-1"	102.2
2"	70.4
3"	70.8
4"	71.7
5"	70.6
6"	17.8
O-CH <sub>3</sub>	

## 凝集抑制作用

実施例1で得られたクエルセチン及び実施例2で得られたラムノース配糖体について血小板凝集に及ぼす影響を測定した。すなわち、PRP-PPP試験の方法に従ってウサギの富血小板血しょう-貧血小板血しょう(platelet rich plasma-platelet poor plasma)を用い、ADP(最終濃度2.0 $\mu$ M)を血小板凝集誘発剤(agonist)として用いて血小板凝集抑制能をAggregometer, PAM\*

\*-8T型にて測定したところ、表1及び図1に示すような血小板凝集抑制能を示し、血小板凝集抑制剤、抗血栓剤、抗動脈硬化剤、脳血栓予防及び治療剤、心筋梗塞予防及び治療剤等として有用に利用されることが判明した。

【0016】

【表1】

化合物	化合物濃度	血小板凝集率(%)
コントロール	0.5mg/ml	0
クエルセチン	0.5mg/ml	-24
配糖体	0.5mg/ml	-90

なお、血小板凝集抑制率は、次の式によって算出した。

血小板凝集抑制率(%) = [(試料の最大凝集能/対照の最大凝集能) - 1]  $\times$  100

この活性値は、現在血小板凝集抑制剤として使用されて※

※いるアスピリンあるいは薬用ニンジンサボニンの活性値より高い。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例3の血小板凝集能を示す。

【図1】

